

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 3 月 14 日 (14.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/20808 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/61, Shinsuke) [JP/JP]. 柘植信昭 (TSUGE, Nobuaki) [JP/JP].  
9/90, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00 朝武宗明 (TOMOTAKE, Muneaki) [JP/JP]; 〒577-8520  
大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号 ハウス食品株  
(21) 国際出願番号: PCT/JP01/07465 式会社内 Osaka (JP).
- (22) 国際出願日: 2001 年 8 月 30 日 (30.08.2001) (74) 代理人: 須藤政彦 (SUDO, Masahiko); 〒103-0022 東京  
都中央区日本橋室町1丁目13番4号 ムロマチ齋藤ビ  
(25) 国際出願の言語: 日本語 ル4階 Tokyo (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CN, JP, NZ, US.
- (30) 優先権データ: 特願2000-267813 2000 年 9 月 4 日 (04.09.2000) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ハウ  
ス食品株式会社 (HOUSE FOODS CORPORATION)  
[JP/JP]; 〒577-8520 大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5  
番7号 Osaka (JP). 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 今井真介 (IMAI, 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。



WO 02/20808 A1

(54) Title: ISOZYMES OF LACRIMATOR COMPONENT SYNTHASE AND GENE ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称: 催涙成分生成酵素のアイソザイム及びそれをコードする遺伝子

(57) Abstract: It is intended to provide isozymes of a lacrimator component synthase, amino acid sequences thereof, genes encoding the same, etc. Three isozymes of a lacrimator component synthase participating in the synthesis of a lacrimator component occurring in onion, etc.; the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:1 to 3 which are these proteins or polypeptides; DNAs having the base sequences represented by SEQ ID NOS:4 and 5 encoding the above proteins or polypeptides; a process for producing the above isozymes: recombinant vectors containing the above DNAs: transformants transformed by the above recombinant vectors: a process for producing proteins or polypeptides having a lacrimator component synthase activity which comprises culturing the host cells; and antisense RNAs respectively having complementary base sequences to mRNAs corresponding to the above DNAs.

[続葉有]



---

(57) 要約:

本発明は、催涙成分生成酵素のアイソザイム、そのアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子等を提供することを目的とするものであり、本発明は、タマネギ等に存在する催涙成分の生成に関与する催涙成分生成酵素の3種のアイソザイム、その蛋白質又はポリペプチドである配列番号1～3に示されるアミノ酸配列、上記蛋白質又はポリペプチドをコードする塩基配列を含有する配列番号4～5に示されるDNA、上記アイソザイムの製造方法、上記DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換した形質転換体、該宿主細胞を培養して、催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチドを製造する方法、及び上記DNAに対応するmRNAに対して相補的塩基配列を有するアンチセンスRNA、に関する。

## 明細書

催涙成分生成酵素のアイソザイム及びそれをコードする遺伝子

## 5 技術分野

本発明は、タマネギ等を粉砕又は切断した時に発生する催涙成分の生成に関与する催涙成分生成酵素のアイソザイムに関するものであり、更に詳しくは、タマネギ等に存在する含硫化合物の  $\text{PeCSO}$  ( $\text{S}-1$ -プロペニルーシステインスルフォキシド) の酵素アリイナーゼによる分解物から催涙成分 (チオプロパナール  $\text{S}$ -オキシド) を生成させる活性を持つ催涙成分生成酵素の 3 種のアイソザイム、そのアミノ酸配列及び当該アイソザイムをコードする  $\text{DNA}$  等に関するものである。

本発明の催涙成分生成酵素のアイソザイム、そのアミノ酸配列及びそれをコードする  $\text{DNA}$  は、例えば、催涙成分の生成を制御すること、破

15 砕又は切断した時に発生する催涙成分の量を低減化させたタマネギ品種の開発において、材料や交配物などの選別指標として使用すること、当該酵素の発現量を抑制するための情報を提供すること、当該酵素を大量に生産すること、催涙成分を大量に生産すること、等を実現化するものとして有用である。

20

## 背景技術

タマネギを粉砕又は切断した時に発生する催涙成分については、これまで、多くの研究成果が報告され、 $\text{S}-1$ -プロペニルーシステインスルフォキシドがアリイナーゼによって分解されると催涙成分が生成され

25 ると考えられて来た。

しかし、本発明者らの研究によって、 $\text{S}-1$ -プロペニルーシステイ

ンスルフォキシドがアリイナーゼによって分解されただけでは催涙成分は生じず、他の酵素（催涙成分生成酵素）の関与が不可欠であることが判明した。

そこで、本発明者らは、鋭意研究を積み重ね、催涙成分生成酵素（催  
5 涙性物質生成酵素）の製造方法を開発すると共に、催涙成分生成酵素の  
理化学的性質をも明かにして、先に、特許出願をした（特開平 1 0 - 2  
9 5 3 7 3 号公報）。

すなわち、タマネギ等に存在する催涙成分（Lachrymatory Factor; L  
F）の形成及びその分解については、これまで、多くの研究成果が報告  
10 されているが、上記催涙成分の生成メカニズムについては、従来は、上  
記前駆物質の P e C S O に酵素アリイナーゼが作用し、スルフェン酸を  
経て非酵素的により安定な催涙成分になると考えられていた。しかし、  
本発明者らが研究したところによれば、実際に、上記成分は酵素アリイ  
ナーゼの作用だけでは生じず、他の酵素の関与が不可欠であることが判  
15 明した。

そこで、本発明者らは、鋭意研究を積み重ね、上記スルフェン酸を異  
性化して催涙成分を生成すると考えられる新しい酵素（催涙成分生成酵  
素）の存在することを見出し、それによって、上記前駆物質は、当該酵  
素の作用の如何によって、催涙成分（香り成分）あるいはこれと別の風  
20 味成分になることが分かった。

この催涙成分生成酵素のアミノ酸配列や、それをコードする D N A 情  
報を用いれば、例えば、タマネギの品種開発において、遺伝子組換えや  
変異の誘導・交配などが効果的に行え、粉碎や切断しても催涙成分が発  
生し難いタマネギの作出などに役立てることができる。

25 一方、催涙成分生成酵素のアミノ酸配列をコードする D N A 情報を利用  
すれば、遺伝子組換え技術等によって当該酵素を大量に生産すること

が可能になり、例えば、涙欠乏症（ドライアイ）などの治療に役立つ催涙成分を効率的に製造する技術の開発にも役立つ。

しかしながら、催涙成分生成酵素のアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子に関しては、これまで、全く報告例がなく、情報がなため、

- 5 催涙成分生成酵素に関する遺伝子レベルでの研究は困難であった。

#### 発明の要約

本発明は、催涙成分生成酵素のアイソザイム、そのアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子等を提供することを目的とするものである。

- 10 本発明は、タマネギ等に存在する催涙成分の生成に関与する催涙成分生成酵素の3種のアイソザイム、その蛋白質又はポリペプチドである配列番号1～3に示されるアミノ酸配列、上記蛋白質又はポリペプチドをコードする塩基配列を含有する配列番号4～5に示されるDNA、上記アイソザイムの製造方法、上記DNAを含有する組換えベクター、該組
- 15 換えベクターで形質転換した形質転換体、該宿主細胞を培養して、催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチドを製造する方法、及び上記DNAに対応するmRNAに対して相補的塩基配列を有するアンチセンスRNA、に関する。

#### 20 発明の開示

- このような状況の中で、本発明者らは、酵素アリイナーゼの存在下でタマネギ等に存在するP e C S Oから催涙成分を生成する作用を有する催涙成分生成酵素の構造を解明することを目標として鋭意研究を積み重ねた結果、催涙成分生成酵素の複数のアイソザイム、そのアミノ酸配列
- 25 及びそれをコードする遺伝子配列の解明に成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、催涙成分生成酵素の 3 種のアイソザイムと、そのアミノ酸配列を提供することを目的とする。

また、本発明は、催涙成分生成酵素のアイソザイム蛋白質又はポリペプチドをコードする遺伝子配列を提供することを目的とする。 また、

- 5 本発明は、上記催涙成分生成酵素のアイソザイムの作用を制御して、催涙成分生成酵素活性の発現を抑制したり、当該酵素活性を阻害したタマネギを作り出すことを実現化する方法等を提供することを目的とする。

- 更に、本発明は、上記遺伝子配列を有する組換えベクター、及び催涙成分生成酵素のアイソザイムを遺伝子組換え技術により効率的に作り出すことを実現化する方法を提供することを目的とする。
- 10

上記課題を解決するための本発明は、以下の技術的手段から構成される。

- (1) タマネギ等に存在する催涙成分前駆体に作用して催涙成分を生成する活性を有する催涙成分生成酵素を、その等電点の差を利用して、精製して得られる催涙成分生成酵素のアイソザイム。
- 15

(2) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列中の 1 もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含み、催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチド。

- (3) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列中の 1 もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含み、催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチド。
- 20

- (4) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列中の 1 もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含み、催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチド。
- 25

(5) 前記 (2)、(3) 又は (4) に記載の蛋白質又はポリペプチドを

コードする塩基配列を含有するDNA。

(6) 蛋白質又はポリペプチドをコードする塩基配列が、配列番号4で示されるDNAである前記(5)に記載のDNA。

(7) 蛋白質又はポリペプチドをコードする塩基配列を含有するDNA  
5 が、配列番号5で示されるDNAである前記(5)に記載のDNA。

(8) タマネギ等に存在する催涙成分前駆体に作用して催涙成分を生成する催涙成分生成酵素を、その等電点の差を利用して、精製することによりアイソザイムE2-1、E2-2、又はE2-3を分離することを特徴とする催涙成分生成酵素のアイソザイムの製造方法。

10 (9) 前記(5)、(6)又は(7)に記載のDNAを含有する組換えベクターで形質転換した宿主細胞を培養し、培地中又は細胞中に産生された催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチドを分離することを特徴とする、催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチドの製造方法。

15 (10) 前記(5)、(6)又は(7)に記載のDNAに対応するmRNAに対して相補的塩基配列を有することを特徴とするアンチセンスRNA。

次に、本発明について更に詳細に説明する。

20 本発明では、上記課題を達成するために、まず、従来法で精製した催涙成分生成酵素(E2)中に含まれるアイソザイムを、その等電点の差を利用して、等電点電気泳動ないしクロマトフォーカシング法によって精製し、3種類のアイソザイムを単離する。次いで、単離した3種類のアイソザイムについて、N末端アミノ酸配列を明らかにし、これから予  
25 想される遺伝子の塩基配列を基にプライマーを設計し、タマネギのmRNAから作製したcDNAを鋳型にしてPCR法によって催涙成分生成

酵素の遺伝子を選択的に合成する。本発明者らは、こうして得た遺伝子の構造解析を行った結果、一つのオープンリーディングフレームが検出され、そこから予想された成熟蛋白質の分子量は、単離したアイソザイムの分子量の実測値(MALDI-TOFMS)と一致したことから、

5 上記遺伝子は、催涙成分生成酵素の遺伝子であることを確認した。

S-1-プロペニル-システインスルフォキシド(PeCSO)のアリイナーゼによる分解物から催涙成分(チオプロパナールS-オキサイド)を生成させる催涙成分生成酵素は、タマネギの風味改質や加工適性の向上に関して重要な成分である。したがって、催涙成分生成酵素の生産や植物育種の分野においては、この催涙成分生成酵素のアミノ酸配列の決定及びそれをコードする遺伝子配列の決定は、極めて有意義である。

本発明者らは、上記催涙成分生成酵素(E2)のアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子配列を明らかにすることを主たる目標として研究をスタートした。すなわち、催涙成分生成酵素の遺伝情報を解明することができれば、例えば、タマネギの加工時に催涙成分が生成しないタマネギ品種の開発などへの応用が期待できる。そこで、E2の構造遺伝子配列を決定し、その遺伝子及びアミノ酸配列を明らかにすることを目標として研究に着手した。

しかし、研究を進めるにつれて、通常の前製方法で得たE2の前製酵素試料ではN末端アミノ酸配列の決定は困難であることが分かった。すなわち、本発明者らが検討したところ、先に、本発明者らが開発した従来の方法で得たE2には、複数のアイソザイムが含まれていること、そのために、E2のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列を解明する前に、アイソザイムの単離が必要となること、が判明した。本発明者らは、これらの知見を踏まえて、更に研究を重ねて、E2の主要アイソザイム3種(E2-1、E2-2、E2-3)を単離し、そのN末端ア



ミノ酸配列を決定した。これを基にプライマーを設計し、PCR等の手法を用いて、各E2アイソザイムをコードする遺伝子配列とアミノ酸配列を決定することに成功した。

更に、この点について詳述すると、従来の方法で精製した催涙成分生成酵素試料は、SDS-PAGEの電気泳動で1バンドとして検出されたので、単一の蛋白質であると推定し、N末端のアミノ酸分析を試みた。しかし、この部分精製試料には、複数のアイソザイムが混在していたため、N末端のアミノ酸配列を特定することはできなかった。

そこで、イオン交換樹脂の種類や溶出条件、ゲルろ過カラムのサイズやゲルの種類等について種々検討し、アイソザイムの分離を試みたが、いずれの方法でも分離できなかった。一方、ネイティブのポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動では、アイソザイムが複数のバンドとして検出できた。そこで、ゲルから切り出して精製する方法を試みた。しかし、この方法では、各アイソザイムの分離が不十分であることや、切り出すアイソザイムの位置が泳動毎に変動したため、正確な切り出しが行えず、純度の高いアイソザイムを得ることはできなかった。こうした試みを繰り返した結果、等電点の差を利用した精製方法である、等電点ゲル電気泳動ないしクロマトフォーカシングを用いれば、複数のアイソザイムを効率的に分離できることが分かった。

尚、等電点電気泳動については、例えば、pH 4.0～6.5のアンフォラインを含むポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、泳動後のゲルを切り出し、水やBufferで溶出してアイソザイムを単離する方法が採用できる。クロマトフォーカシングについては、例えば、Mono Pカラム（ファルマシア製）を無水ピペラジン-HCl Bufferで平衡化した後、Poly Buffer 74（ファルマシア製）を用いたBufferで溶出してアイソザイムを単離することができる。

部分精製試料中に含まれる、主要なアイソザイムは、3種類（E 2 - 1、E 2 - 2、E 2 - 3）であったので、この3種類のアイソザイムを、等電点ゲル電気泳動やクロマトフォーカシングで精製した。しかし、この様な精製方法を採用しても、純度の高いアイソザイムを得るためには、  
5 精製操作を数回繰り返して行う必要があった。このような経過をへて、本発明者らは、主要な3種のアイソザイムの単離に成功した。

上記催涙成分生成酵素試料は、好適には、タマネギ等を原料として、抽出、精製し、製造されるが、原料として、タマネギと同様に、上記酵素含有材料であれば、タマネギ以外のものを使用することができる。こ  
10 の場合、上記酵素の抽出、精製工程として、例えば、以下の方法が好適なものとして例示される。

すなわち、例えば、タマネギを原料とし、これを水で加水し、ミキサー等で破碎する。得られた破碎物を遠心し、その上澄み液を塩析して蛋白質を沈澱させる。次いで、上記沈澱物をリン酸バッファー等の緩衝液  
15 に溶解し、遠心し、その上澄み液を粗酵素液として採取する。

ここで、緩衝液としては、各種のものが使用できるが、例えば、リン酸カリウムバッファー、クエン酸バッファー、酢酸バッファー、酒石酸バッファー、コハク酸バッファー、マレイン酸バッファー、T r i s - H C l バッファー、クエン酸ーリン酸バッファー、等が例示される。

20 次に、上記方法によって得られた粗酵素液を、例えば、ハイドロキシアパタイト、硫酸塩析、透析、陰イオン交換、ゲル濾過等の手段を適宜組合わせて、精製処理することにより、部分生成酵素液とすることができる。

粗酵素液からの上記酵素の部分精製は、上記方法に限らず、公知の分離、精製方法が適用できるが、例えば、粗酵素液から硫酸塩析法、有機溶媒沈澱法などにより粗酵素蛋白を得て、更に、これをイオン交換、ゲ  
25

ル濾過、アフィニティー等の各種クロマトグラフィーを適宜組合わせることによって精製処理することができる。

- 催涙成分生成酵素のアイソザイムのcDNAを取得する具体的な方法としては、例えば、E2-1～E2-3の各N末端アミノ酸配列をもとにcDNAプローブを作製し、タマネギのバルブから抽出したE2のmRNAを鋳型にして作製したcDNAライブラリーからハイブリダイゼーションにより、E2のcDNAを釣り上げる方法や、mRNAのポリA鎖にアンカーを付加し、これに相補するプライマーとE2-1～E2-3の各N末端アミノ酸配列をもとに作製したプライマーを用い、mRNAから合成したcDNAを鋳型にしてPCR法で、E2の3'末端側配列を明かにした後、5' RACE法で5'末端側配列を明らかにする方法など、が例示される。上記3種類のアイソザイムは、好適には、例えば、以下の方法によりその遺伝子配列を決定することができるが、以下の方法に制限されるものではない。
- 1) タマネギの鱗片からフェノール／SDS／LiCl法でトータルRNAを抽出する。
  - 2) トータルRNAをオリゴdTカラムで処理してmRNAを精製する。
  - 3) mRNAを逆転写酵素で処理してcDNAを合成する。
  - 4) E2-1のN末端アミノ酸5残基を基にして作製した、デジェネレートプライマーとポリA鎖の末端に付けたアンカー部分に対応するプライマーを用いてPCRを行い、E2-1の下流側に由来する増幅産物を得る。
  - 5) 得られたPCR増幅産物を精製した後、サブクローニングして、塩基配列を明らかにする。
  - 6) PCRで得られた増幅産物がE2-1に由来することは、E2-1のMALDI-TOFMSによる分子量測定結果とアミノ酸配列から予

測される分子量が良く一致することから確認できる。

7) E 2 - 1 の内部配列から設計したプライマーと、5' 末端に付加したオリゴ d C 鎖に付けたアンカーから設計したプライマーを用いた P C R (5' R A C E) を行い、上流側に由来する増幅産物を得る。

- 5 8) 得られた P C R 増幅産物を精製した後、サブクローニングして、塩基配列を明らかにする。

シークエンスの分析結果を解析し、E 2 - 1 のオープンリーディングフレーム (O R F) の存在を確認した結果、E 2 - 1 は 1 6 9 個のアミノ酸からなる蛋白質として合成された後、プロセッシングによって N 末端の 1 6 個のアミノ酸が除かれ、成熟した蛋白質になることが判明した。

すなわち、催涙成分生成酵素のアイソザイムの c D N A を取得し、解析した結果、上記 E 2 - 1、E 2 - 2、E 2 - 3 は、同じ遺伝子を基に蛋白質に翻訳されるが、その後のプロセッシングのされ方の違いによって、E 2 - 1、E 2 - 2、E 2 - 3 になることが分かった。また、E 2 - 2 の N 末端から 2 番目、並びに、E 2 - 3 の N 末端から 4 番目のアミノ酸は、A s n が翻訳後、A s p に変化することも分かった。この様にして、E 2 - 1、E 2 - 2、E 2 - 3 の遺伝子配列とアミノ酸の一次配列を決定した。

20 E 2 - 2 と E 2 - 3 は、同一の遺伝子を基に合成され、プロセッシングの違いにより生じるアイソザイムであることが、実験の結果、明らかとなった。

E 2 - 3 の N 末端アミノ酸配列を 1 0 残基まで解析した結果、E 2 - 2 の N 末端アミノ酸配列 5 残基は、E 2 - 3 の N 末端 3 残基目から 7 残基目と完全に一致することが分かった。

25 (E 2 - 2 の N 末端アミノ酸配列)

Ala Asp Gly Ala Arg

(E 2 - 3 の N 末端アミノ酸配列)

Asp Ser Ala Asp Gly Ala Arg Lys Trp Ser

この結果から、E 2 - 3 は、E 2 - 2 の N 末端側に Ser と Asp が付加した蛋白質であることが分かった。

- 5     以上の結果から、E 2 - 2 と E 2 - 3 は、同一の遺伝子を基に合成されていると考えられる。

- 次に、E 2 - 3 の遺伝子配列を解明するため、E 2 - 3 の N 末端アミノ酸 9 残基を基にして作製したデジェネレートプライマーと、ポリ A 鎖の末端に付けたアンカーから設計したプライマーを用いて P C R を行い、  
10   増幅産物を得る。

得られた P C R 増幅産物を精製した後、サブクローニングして、塩基配列を明らかにする。

シークエンスの分析結果を解析した結果、E 2 - 3 の下流側配列は、E 2 - 1 で確認した配列と一致することが分かった。

- 15   ここで、E 2 - 3 の下流側配列は、E 2 - 1 で確認した配列と一致したため、5' R A C E 用プライマーは、E 2 - 1 の上流配列を確認するために使ったプライマーと同じになる。

- 5' R A C E では共通したアンカープライマーを用いるので、E 2 - 3 の上流配列が E 2 - 1 の上流配列と違うとすると、E 2 - 1 で行った  
20   5' R A C E の増幅産物には、E 2 - 3 の上流配列と E 2 - 1 の上流配列の両方が含まれ得ることが考えられる。

そこで、異なる組換え体コロニーから D N A を抽出して、E 2 - 1 の 5' R A C E 産物を更に 2 回シークエンスした。

- 解析の結果、追加して行った 2 個の 5' R A C E 産物の配列は、先に  
25   解析した E 2 - 1 の上流配列と一致した。

以上の結果、E 2 - 3 の上流配列も E 2 - 1 の上流配列と同じである

可能性が高いと考えられる。

そこで、種々検討を重ねた結果、E 2 - 3 は E 2 - 1 と同じ遺伝子を元に翻訳されること、並びに、成熟した蛋白質になる過程で、Asn から Asp に変化する、との結論を得た。

- 5      上記結論が正しいことは、E 2 - 2 と E 2 - 3 の MALDI - TOF MS による分子量測定結果とアミノ酸配列から予測される分子量がよく一致することからも確認できる。

E 2 - 2 ( 1 5 5 アミノ酸 ) の分子量は 1 7 6 8 9 、実測値は 1 7 7 2 2 。

- 10      E 2 - 3 ( 1 5 7 アミノ酸 ) の分子量は 1 7 8 9 2 、実測値は 1 7 9 0 9 。

次に、P e C S O 、アリイナーゼ、E 2 の混合系における至適 p H と至適温度について説明する。

E 2 の至適 p H は、いずれも 4 . 5 ~ 5 . 0 で 3 者に大きな差はない。

- 15      E 2 - 1 ~ 3 の至適温度についても、1 5 ℃ から 2 5 ℃ の室温領域であり、大きな差はないことが判った。

- 20      上記 3 種類のアイソザイムは、いずれも分子量、至適 p H 及び催涙成分を生成する作用において、著しい一致をみせている。本発明においては、いずれのアイソザイムも、本発明の催涙成分生成酵素のアイソザイムに包含される。

なお、E 2 - 1 を試料にして、N 末端アミノ酸分析を行ったところ、含有量が少ない他の 2 種類のアイソザイム ( E 2 - 1 - 1 、 E 2 - 1 - 2 と命名した ) が検出され、これらの N 末端アミノ酸配列も決定した。

- 25      すなわち、粗精製した E 2 試料中には、上記した 3 種類のアイソザイムの他、マイナーなアイソザイム ( E 2 - 1 - 1 、 E 2 - 1 - 2 ) も存在した。

各アイソザイムのN末端アミノ酸配列と分子量測定値を以下に示す。

		分子量	
(アイソザイム)	(N末端のアミノ酸配列)	(MALDI-TOFMS)	
E2-1	Gly Ala Arg Lys Trp	17465	
5 E2-1-1	Ala Arg Lys Trp		
E2-1-2	Ser Ala Asn Gly Ala		
E2-2	Ala Asp Gly Ala Arg	17722	
E2-3	Asp Ser Ala Asp Gly Ala Arg Lys Trp Ser	17909	

- 10 E 2 - 2 のN末端から 2 番目と E 2 - 3 のN末端から 4 番目の Asp は、Asn の形で合成された後、Asp に変換されると考えられるため、上記の位置の Asp が Asn である E 2 - 2、E 2 - 3 も存在すると推測される。配列から判明した分子量は、E 2 - 1 (1 5 3 アミノ酸) は 1 7 5 0 3、E 2 - 2 (1 5 5 アミノ酸) は 1 7 6 8 9、E 2 - 3 (1 5 7 アミノ酸) は 1 7 8 9 2 であり、MS での測定値と近い。

15 本発明の催涙成分生成酵素のアイソザイムをコードする DNA は、配列番号 4 の塩基配列で表される DNA、及び上記蛋白質のアミノ酸配列に 1 もしくは複数のアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を行って得られる誘導体を含む蛋白質又はポリペプチドをコードする DNA を包含する。

20 本発明の催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチドは、上記酵素活性を有し、上記蛋白質のアミノ酸配列にアミノ酸の付加、欠失、もしくは置換を行って得られる誘導体を含む蛋白質又はポリペプチド、配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列で表される、上記酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチドを包含する。

25 本発明の上記 E 2 のアイソザイムをコードする DNA、上記アミノ酸

配列は、例えば、催涙成分の生成を制御する方法、これらを指標として、交配に供するタマネギを選抜する方法、催涙成分生成酵素活性を低減させたタマネギの品種を作出する方法、催涙成分生成酵素を遺伝子組換え技術により大量に生産する方法、等を実現させるものとして有用である。

5

本発明の催涙成分生成酵素のアイソザイムの応用例として、例えば、以下の例が例示される。

#### (1) 催涙成分生成酵素の生産

前記のようにして得た催涙成分生成酵素のアイソザイムの cDNA を  
10 適宜の発現ベクターに組み込んで、組換えベクターを作製することができる。

使用するベクターは、宿主細胞内で自律的に複製可能であって、上記 DNA、すなわち、E2 アイソザイム遺伝子を組み込み得る挿入部位を持ち、更に、この組み込んだ DNA を宿主細胞内で発現せしめることを  
15 可能とする領域を有するものであれば、その種類は、特に制限されない。

また、ベクターに組み込む E2 アイソザイム遺伝子としては、本発明の催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチドをコードするように設計して合成された DNA を用いることができる。また、組み込む生物種での発現を促進するために、組み込む生物種に合わせてコドン  
20 を変換することがあるが、これらのコドン変換された DNA も本発明の範囲に含まれることは云うまでもない。この様なアミノ酸配列を基にした遺伝子の合成は、例えば、DNA 自動合成機を利用して合成したオリゴヌクレオチドをアニール後に連結する等の方法により、適宜実施することができる。

25 更に、E2-1、E2-2、E2-3 では、N 末端のアミノ酸配列が異なるにも拘わらず、酵素的性質は、著しく一致していることから明



白なように、1もしくは複数の一部のアミノ酸が付加、欠失しても、天然のE2と同じ酵素的性質が得られる可能性がある。また、一部のアミノ酸残基が置換しても、結果として天然のE2と同じ酵素的性質が得られる可能性がある。このような遺伝子の改変は、市販遺伝子の部位特異的変異導入キットを用いたり、合成遺伝子を挿入する等の方法により、容易に実現することが可能である。したがって、ベクターに組み込むE2アイソザイム遺伝子としては、天然のE2と同じ酵素的性質が維持されている限り、その変異体であってもよい。次いで、上記組換え発現ベクターを宿主細胞に導入し、形質転換体を得る。組換え発現ベクターの宿主細胞への導入は、慣用的に用いられている方法により行うことができる。その方法として、例えば、コンピテントセル法、プロトプラスト法、リン酸カルシウム共沈法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポソーム融合法等、種々のものが例示されるが、用いる宿主に応じてそれぞれ任意の方法を採用すればよい。本発明のE2のアイソザイムを産生する宿主としては、好適には、大腸菌、枯草菌、酵母、麹菌などの微生物、カイコ培養細胞等の細胞が例示される。

上記のようにして得られた形質転換体を培養することにより、培養物中にE2のアイソザイムを生産させることができる。これを公知の方法で単離し、あるいは精製することにより、安定に催涙成分生成酵素のアイソザイムを得ることが可能となる。

(2) アンチセンスRNAによる催涙成分を生成しない植物の生産 本発明のE2のアイソザイムをコードする遺伝子の塩基配列に基づいて、アンチセンスRNAを植物内で発現させることにより、上記遺伝情報の発現を抑制することができる。アンチセンスRNAは、mRNAに対して相補的塩基配列を持ち、mRNAと塩基対を形成することにより、遺伝情報を遮断し、最終産物であるE2のアイソザイムの蛋白質合成を抑

制する。本発明において使用できるアンチセンスRNAは、配列番号5に示す塩基配列を元に合成されるmRNAと特異的にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドである。

アンチセンスヌクレオチドのターゲット部位は、遺伝子によって様々であり、どの部位が必ずよいと言うコンセンサスはない。しかし、一般的には、ATGスタートサイトなどが、ターゲット部位の候補になり得る。更に、最近では、ターゲット部位とアンチセンスヌクレオチドをデザインするためのコンピューター解析ソフト（HYB simulatorなど）も数種発売されているので、これらを利用してアンチセンスヌクレオチドを設計することも可能である。なお、アンチセンスヌクレオチドの長さは、18～23mer、GCコンテンツは50%以上が好ましい。

上記アンチセンスRNAを植物内で機能させる方法としては、例えば、発現ベクターのプロモーターの下流にcDNAを逆向きに組み込んで宿主細胞に導入してアンチセンスRNAを合成させる方法が例示される。

外来遺伝子を導入する方法としては、アグロバクテリウムによる形質転換方法や、直接導入による形質転換法を用いることができるが、タマネギなどの単子葉植物については、特に直接導入による形質転換方法で良好な結果が得られている（Klein, T. M. et al. Nature 327, 70-73, 1987 参照）ので、直接導入する方法が好ましい。

### （3）E2蛋白質の大量生産

本発明におけるE2蛋白質のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有する発現型ベクターは、例えば、（イ）E2をコードするRNAを単離し、（ロ）該RNAから単鎖のcDNAを、次いで二重鎖DNAを合成し、（ハ）該cDNAをプラスミドに組み込み、（ニ）得られたプラスミドで宿主を形質転換し、（ホ）得られた形質転換体を培養

後、適当な方法により、目的とするプラスミドを単離し、(へ)そのプラスミドからクローン化DNAを切り出し、(ト)該クローン化DNAを発現型ベクターのプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

- 5 E2をコードするRNAは、E2を含有する材料であれば、タマネギ以外のものも使用することができる。E2含有材料からRNAを調製する方法としては、フェノール/SDSとLiCl法(細胞工学別冊、細胞工学シリーズ2、植物のPCR実験プロトコールp51 秀潤社)などが挙げられる。このようにして得られたRNAを鋳型とし、逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、得られたcDNAをプラスミドに組み込む。
- 10

- cDNAを組み込むプラスミドとしては、例えば、大腸菌由来のpBR322(ジーン(gene), 2, 95(1977)), pBR325(ジーン, 4, 121(1978)), 枯草菌由来のpUB110(バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochemical and Biophysical Research Communication), 112, 678(1983))などが挙げられるが、その他のものであっても、宿主内で複製保持されるものであれば、いずれも用いることができる。プラスミドに組み込む方法
- 15
- 20
- 25
- としては、ベクターとインサートのモル比を1:1から1:10にした混合液を作製し、T4リガーゼで処理する方法が一般的である(細胞工学別冊、バイオ実験イラストレイテッド(2)遺伝子解析の基礎、p78、秀潤社)。このようにして得られたプラスミドは、適当な宿主、例えば、エシェリキア(Escherichia)属菌、バチルス(Bacillus)属菌などに導入する。

上記エシェリキア(Escherichia)属菌の例としては、エシェ

リキア・コリ (*Escherichia coli*) (プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*) 60, 160 (1968)) などが挙げられる。上記バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) M1114 (ジーン, 24, 255 (1983)) などが挙げられる。形質転換する方法としては、カルシウムクロライド法 (バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション, 49, 1568 (1972)) などが挙げられる。このようにして得られた形質転換体中から、公知の方法、例えば、コロニー・ハイブリダイゼーション法 (ジーン, 10, 63 (1980)) 及びDNA塩基配列決定法 (プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス, 74, 560 (1977)) などを用い、求めるクローンを選出する。このようにして、クローン化されたE2をコードする塩基配列を含有するDNAを有するベクターを保持する微生物が得られる。

次に、該微生物からプラスミドを単離する。単離法としては、アルカリ法 (ヌクレイック・アシッド・リサーチ (*Nucleic Acids Research*), 1513 (1979)) などが挙げられる。上記クローン化されたE2をコードする塩基配列を含有するプラスミドは、そのまま、又は所望により制限酵素で切り出す。クローン化された遺伝子は、発現に適したベクター中のプロモーターの下流に連結して発現型ベクターを得ることができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例えば、pBR322)、枯草菌由来のプラスミド (例えば、pUB110)、酵母由来プラスミド (例えば、pSH19) あるいは入ファージなどのバクテリオファージ及びレトロウィルス、ワクシニアウィルスなどの動物ウィルスなどが挙

げられる。該遺伝子はその5'末端に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGA、又はTAGを有しても良い。また、既知の蛋白質をコードする遺伝子の3'末端に該遺伝子の5'末端を結合させ、融合蛋白質として発現させる場合は、翻訳開始コドンは必ずしも必要としない。更に、該遺伝子が発現させるためにはその上流にプロモーターを接続する。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでも良い。また、形質転換する際の宿主がエシェリキア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーターなどが好ましい。とりわけ宿主がエシェリキア属菌でプロモーターがlacプロモーターであることが好ましい。

15 宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウィルスのプロモーターなどが挙げられ、とりわけSV40由来のプロモーターが好ましい。

このようにして構築されたDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。宿主としては、エシェリキア属菌、バチルス属菌、

20 酵母、動物細胞などが挙げられる。上記エシェリキア属菌、バチルス属菌の具体例としては、前記したものと同様のものが挙げられる。上記酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22Rなどが挙げられる。動物細胞としては、例えば、去る細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHOなどが挙げられる。この様にして、DNAを

25 含有するベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

その一例としては、例えば、後述の実施例（１１）で得られた *Escherichia coli* BL21/pGEX-4T-3-E2-3-1 が挙げられ、該微生物は、ブタペスト条約に基づき、２００１年７月２５日に独立行政法人産業技術研究所特許生物寄託センターに受託番号 FERM BP-7675 として寄託され、同研究所に保管されている。宿主がエシェリキア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。

- 10 エシェリキア属菌を培養する際の培地としては、例えば、LB 培地や SOC 培地（細胞工学別冊 バイオイラストレイテッド、１．分子生物学実験の基礎、p 98-99、秀潤社）が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率良く働かせるために、例えば、イソプロピル- $\beta$ -D-ガラクトシド（IPTG）のような薬剤を加えることができる。
- 15 宿主がエシェリキア属菌の場合、培養は通常 15～43℃で 3～24 時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス菌属の場合、培養は通常約 30～40℃で約 6～24 時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー最小培地（プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス 77, 4505（1980））が挙げられる。培地の pH は約 5～8 に調整するのが好ましい。培養は通常 20℃～35℃で約 24～72 時間行い、必要に応じて、通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5～20% の胎児牛血清を含む MEN 培地（サイエンス（Science）122, 501（1952））DMEM 培地（ウイルス学（Virology）、8、39
- 20
- 25

6 (1959)) などが挙げられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃から40℃で約15時間から60時間行い、必要に応じて、二酸化炭素濃度を高めることができる。

上記培養物からE2蛋白を分離精製するには、例えば、下記の方法により行うことができる。E2蛋白を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体又は細胞を集め、これを塩酸グアニジンなどの蛋白変性剤を含む緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム及び（又は凍結融解）によって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心分離によりE2蛋白を得る方法などが適宜用いられる。上記上澄液からE2蛋白を精製するには、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離、精製方法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解性を利用する方法、透析法、ゲルろ過法などの分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法などが挙げられる。

#### 図面の簡単な説明

- 図1は、Mono Pでの溶出パターンを示す。
- 図2は、アイソザイムの至適pHを示す。
- 図3は、アイソザイムの至適温度を示す。
- 図4は、737塩基から成る全長の塩基配列及びE2のアミノ酸配列を示す。
- 図5は、EcoRIとNotIで切り出された673塩基から成るE2-3-1の塩基及び160個のアミノ酸配列を示す。
- 図6は、EcoRIとNotIで切り出された673塩基から成るE

2-3-2の塩基及び160個のアミノ酸配列を示す。

図7は、E2-3-1及びE2-3-2のcDNAの作製及びサブクローニングの手順を示す。

図8は、発現プラスミドの構築と形質転換体の作製手順を示す。 図  
5 9は、グルタチオンセファロース4 Fast Flowカラムからの溶出液を5000倍に希釈した試料で行った活性測定結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

次に、実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明は以下  
10 の実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例

(1) 催涙成分精生成酵素のアイソザイムの単離

催涙成分生成酵素試料は、タマネギを原料として、本発明者らが開発した従来の方法(特開平10-295373号公報)を用いて作製した。

15 1) クロマトフォーカシングによる精製

クロマトフォーカシング用カラムであるMono P HR5/20  
(5φ×200mm)(ファルマシア製)をStart buffer  
(0.025M無水ピペラジンをHClでpH5.7に調整したもの)  
で平衡化した後、500μlの試料をアプライした。アプライ後は、E  
20 luent buffer(ファルマシア製10% Poly buffer  
をHClでpH4.0に調整したもの)にて溶出し、溶出液を分  
画して回収した。溶出液の流速は0.5ml/min、分析温度は4℃  
とし、280nmの吸収と催涙成分生成酵素活性を測定した。

2) 活性の測定方法

25 活性の測定方法は、試料を希釈用Buffer(50mMリン酸カリ  
ウムBuffer pH6.5)で希釈し、希釈試料10μlに、ニン



ニクアリナーゼ (50 units/ml) 40  $\mu$ l と P e C S O 溶液 (20 mg/ml) 20  $\mu$ l を加え、室温で3分間反応させた後、反応液 1  $\mu$ l を H P L C にアプライし、催涙成分の生成量を定量した。なお、分析には O S D カラム (4.6  $\phi$  × 250 mm) (センシュウ科学社製)、  
5 又は D O C O S I L カラム (4.6  $\phi$  × 250 mm) (センシュウ科学社製) を用いた。その他、移動相には 30% (v/v) の酸性 M e O H を、流速は、0.6 ml/min、カラム温度は 35℃、検出は 254 nm とした。

### 3) 結果

10 M o n o P カラムでの精製の結果、E 2 には複数のアイソザイムが存在すること、並びに含有量が高いアイソザイムはそのうちの、3種類であることが分かった。そこで、この3種類のアイソザイム (E 2 - 1、E 2 - 2、E 2 - 3) を単離した。

15 M o n o P カラムからの代表的な溶出パターンを図 1 に示す。E 2 - 1 はフラクション N o . 4、E 2 - 2 はフラクション N o . 6、E 2 - 3 はフラクション N o . 10、11 である。また、E 2 - 1 には微量成分として E 2 - 1 - 1 及び E 2 - 1 - 2 が含まれていた。

N 末端のアミノ酸配列を確定できた E 2 のアイソザイムは、含有量が多い 3 種類と、含有量が少ない 2 種類の全 5 種類であった。

20

### (2) アイソザイムの至適 pH 及び至適温度の比較

精製した E 2 - 1、E 2 - 2、E 2 - 3 の各試料を 350 mM のリン酸カリウム B u f f e r (pH 2.4 ~ 8.0) で希釈し、上記 (1) と同じ方法で活性を測定した。反応液の pH は反応終了後に実測した。  
25 活性の強さは、最大活性を示した点を 100% とし、相対値で評価した。

実験の結果、E 2 の各アイソザイムの至適 pH はいずれも 4.5 ~ 5.

0 で類似していることが判明した。至適 pH の測定結果を図 2 に示す。

上記 (1) で示した方法で反応液を作製し、反応温度を 0℃ から 60℃ まで変化させた。活性の強さは、最大活性を示した点を 100% とし、相対値で評価した。実験の結果、E2 の各アイソザイムの至適温度はい  
5 ずれも 15℃ ～ 25℃ で類似していることが判明した。至適温度の測定結果を図 3 に示す。

### (3) 催涙成分生成酵素のアイソザイムの N 末端アミノ酸配列の決定

等電点電気泳動及びクロマトフォーカシングで精製した催涙成分生成  
10 酵素のアイソザイムを、フェニルイソチオシアナート法で分析することによって、N 末端アミノ酸配列を決定した。この場合、プロテインシークエンサーとしては、G100A (HEWLETT PACKARD) を、また、PTHアナライザーとしては、1090 (HEWLETT PACKARD) を使用した。

15 得られた N 末端アミノ酸配列は、以下の通りであった。

試料名	含有量	配 列
E2-3	多い	Asp Ser Ala Asp Gly Ala Arg Lys Trp Ser
E2-1-3	少ない	Ser Ala Asn Gly Ala
E2-2	多い	Ala Asp Gly Ala Arg
20 E2-1	多い	Gly Ala Arg Lys Trp
E2-1-2	少ない	Ala Arg Lys Trp

### (4) タマネギ由来の cDNA の合成

タマネギの鱗片 2.4 g から、フェノール/SDS/LiCl 法によ  
25 って全 RNA を調製した。更に、オリゴ dT セルロースカラムクロマトグラフィーによって、mRNA を含むポリ A-RNA 1.5 μg を単離

し、これを鋳型としてオリゴdTプライマーと逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。全RNAからmRNAの調製には、mRNA Purificationキット（ファルマシア製）を、また、mRNAを鋳型とするcDNAの合成には、RTG-T-Primed First-Strandキット（ファルマシア製）を用いた。

（5）E2-1をコードするcDNAの3'末端側塩基配列の決定 E2-1のN-末端アミノ酸配列からDNAの塩基配列を推定し、合成プライマー、5'-GGIGCI (A/C) GIAA (A/G) TGG-3'を作製した。また、オリゴdTプライマーに付けたアンカー部分に相補するリバースプライマー、5'-TGGAGGAATTCGCGGCCGCAAG-3'も作製した。作製した2つのプライマーを用いて、タマネギ由来のcDNAを鋳型として、サーマルサイクラー（PEバイオシステムズ社製）を用いて、以下の温度条件下でPCR反応を行った。

すなわち、95℃、9分間の熱変性の後、94℃、1分間の熱変性、続いて43℃、1分間のアニーリング、72℃、1分間の伸長反応を40サイクル繰り返し、その後、72℃、2分間の伸長反応を行って反応を停止した。その結果、約660bpの単一な産物を得た。尚、プライマーの塩基配列において、「/」は「又は」を、「I」はイノシンを示す。

（6）PCRで増幅されたE2-1をコードするcDNAの3'末端側の塩基配列の解析

PCRで増幅された約660bpの塩基配列を決定するために、増幅産物をアガロースゲルから切り出して精製し、pGEM-T Easy Vectorにサブクローニングした。これを大腸菌（XL1-Blue

e) に導入し、増幅させた後、組換え大腸菌からプラスミドを採取し、精製した。このプラスミドを試料とし、ダイデオキシ法によって3'末端側の塩基配列を決定した。

5 (7) E2-1 をコードする cDNA 5' 末端側塩基配列の決定

E2-1 の5' 末端側 cDNA の解析には、5' RACE 法を用いた。具体的には、5' RACE システムキット (LIFE TECHNOLOGIES 社) を用い、mRNA から合成した cDNA の5' 末端にオリゴ dC を tailing して、これを鋳型として用いた。プライマーには、キット付属の Anchor primer、5' -GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIIG-3' と E2-1 の3' 末端側 cDNA の解析で判明した配列を基に作製したリバースプライマー、5' -TCCTCGTACCCCTGTAAACACTCAG-3' を用い、サーマルサイクラー (PE バイオシステムズ社製) を用いて以下の温度条件下で PCR 反応を行った。

すなわち、95℃、9 分間の熱変性の後、94℃、1 分間の熱変性、続いて 55℃、1 分間のアニーリング、72℃、1 分間の伸長反応を 40 サイクル繰り返し、その後、72℃、7 分間の伸長反応を行って反応を停止した。その結果、約 430 bp の単一な産物を得た。

20

(8) E2-1 由来 cDNA の5' 末端側の塩基配列の解析

PCR で増幅された約 430 bp の塩基配列を決定するため、増幅産物をアガロースゲルから切り出して精製し、前記 3' 末端側の塩基配列の場合と同じ手順で配列を決定した。3' 側及び 5' 側の解析により得られた全長の塩基配列を配列番号 5 に示す。また、配列番号 5 に検出されたオープンリーディングフレーム部分の配列を配列番号 4 に示す。

25

(9) 塩基配列から得られたアミノ酸配列

配列番号4に示した塩基配列からアミノ酸配列を推測し、これを、E 2-1のN末端アミノ酸配列と比較したところ、該当する配列が見出されたため、単離されたcDNAは催涙性物質生成酵素のアイソザイムE 2-1のcDNAであることが確認された。更に、MALDI-TOF MSで測定したE 2-1の分子量は、塩基配列から得られたアミノ酸配列から推測される分子量と良く合致することも確認した。

E 2-1分子量：測定値17465、計算値17503

10 更に、単離されたcDNAがコードする蛋白質のアミノ酸配列と成熟蛋白質のアミノ酸配列を比較検討した結果、cDNAがコードする蛋白質のN末端側に、成熟蛋白質には含まれないペプチドが存在することが見出された。その結果、E 2-1は蛋白質への翻訳後、N末端側16個のアミノ酸が切断され成熟蛋白質になることが確認された。この成熟したE 2-1のアミノ酸配列を配列番号1に示した。

(10) E 2-2、E 2-3のアミノ酸配列の決定

上記(2)～(9)の方法と同様の方法により、E 2-2、E 2-3のアミノ酸配列を決定した。

20 前述のアイソザイムのN末端アミノ酸配列の分析結果から、E 2-2は、E 2-1よりN末端側のアミノ酸が2残基分長い産物、E 2-3は4残基分長い産物であろうと予測されたが、実際には、E 2-1をコードする遺伝子から推定されるアミノ酸をE 2-2、E 2-3のN末端アミノ酸と比較すると1箇所だけ合致しないことが判明した。

25 合致しなかったアミノ酸は、E 2-2のN末端から2残基目、E 2-3のN末端から4残基目のアスパラギン酸で、E 2-1をコードする遺

伝子では、アスパラギンがコードされていた。したがって、E 2 - 1 をコードする遺伝子とE 2 - 2 やE 2 - 3 をコードする遺伝子が異なる可能性が考えられたため、前記E 2 - 1 の場合と同様の方法で、E 2 - 2 及びE 2 - 3 をコードする遺伝子を解析した。

- 5      先ず、3' 末端側塩基配列の決定用に、E 2 - 3 のN - 末端アミノ酸 9 残基の配列から、次のE 2 - 3 - N 9 - 1 とE 2 - 3 - N 9 - 2 並びにE 2 - 3 - A s p の3 種類の合成プライマーを作製した。

E 2 - 3 - N 9 - 1 . . 5' - G A ( C / T ) A G ( C / T ) G C I ( A / G ) A ( C / T ) G G I G C I C G I A A ( A / G ) T G G - 3'

10

E 2 - 3 - N 9 - 2 . . 5' - G A ( C / T ) T C I G C I ( A / G ) A ( C / T ) G G I G C I C G I A A ( A / G ) T G G - 3'

E 2 - 3 - A s p . . 5' - G A T A G T G C T G A ( C / T ) G G A G C T C G A A A A T G G - 3'

15

- E 2 - 3 - N 9 - 1 のプライマーと前記 ( 5 ) で合成したリバースプライマーとの組み合わせ、及びE 2 - 3 - N 9 - 2 のプライマーとリバースプライマーとの組み合わせ、E 2 - 3 - A s p のプライマーとリバースプライマーとの組み合わせで、タマネギ由来のc D N Aを鋳型として、サーマル サイ클ラー ( P E バイオシステムズ社製) を用いてP C R 反応を行った。なお、P C R 条件は、アニーリング温度を5 3 ° C に変更した以外、前記 ( 5 ) の場合と同様にした。
- 20

- P C R の結果、いずれのプライマーの組み合わせでも約6 6 0 b p の単一な産物が得られた。また、得られた3 種類の産物の塩基配列は、プライマー部分を除き、E 2 - 1 の配列と一致した。この結果は、E 2 - 2 及びE 2 - 3 をコードする遺伝子の3' 末端側塩基配列はE 2 - 1 を
- 25

コードする遺伝子の配列と同じであることを示す。

次に、5'末端側塩基配列の決定を行った。前記(7)の場合と同様の手順で増幅させた産物について、更に、シーケンスを2度行った結果、増幅産物の塩基配列は、いずれもE2-1の5'末端側配列と一致した。

以上の結果より、E2-2及びE2-3をコードする遺伝子は、E2-1をコードする遺伝子と同一であることが示唆された。

E2のアイソザイムをコードする遺伝子が同一であることから、E2-2のN末端から2残基目、及びE2-3のN末端から4残基目のアスパラギン酸は、アスパラギンとして翻訳された後、アスパラギン酸に変換されることが判明した。

アスパラギンがアスパラギン酸に変化する反応については、Journal of Liquid Chromatography, 15 (6 & 7), 1115-1128 (1992)などに紹介されており、アスパラギンのC末端側にグリシンが結合すると、アスパラギン酸への変化が起き易いことが報告されている。

なお、塩基配列から推定されるE2-2の分子量(17689)は、E2-2分子量測定値(17722)と、E2-3の分子量(17892)は、E2-2分子量測定値(17909)とほぼ合致したことから、E2-2やE2-3をコードする塩基配列はE2-1をコードするcDNA配列と同一であることを確認した。

以上の結果より、E2-2は、蛋白質への翻訳後、N末端側14個のアミノ酸の切断と、N末端から2残基目のアスパラギンがアスパラギン酸への変換を受けて、成熟蛋白質になること、E2-3は、蛋白質への翻訳後、N末端側12個のアミノ酸の切断と、N末端から4残基目のアスパラギンがアスパラギン酸への変換を受けて、成熟蛋白質になること

が判明した。

その結果を、配列番号 2、配列番号 3 に各々示す。更に、上記 E 2 - 1、E 2 - 2、E 2 - 3 をコードする遺伝子領域を含む 5 0 7 塩基から成る構造遺伝子 (O R F) の塩基配列を配列番号 4 に、また、7 3 7 塩基から成る全長の塩基配列を配列番号 5 に、更に当該全長の塩基配列及び E 2 のアミノ酸配列を図 4 に示す。

#### (1 1) 発現プラスミドの構築

本実施例の E 2 - 2、E 2 - 3 のアミノ酸配列の決定で述べた方法に従い、E 2 - 3 - N 9 - 1 のフォワードプライマーとオリゴ d T プライマーに付けたアンカー部分に相補するリバースプライマー (前記 (5) で合成したリバースプライマー) を使い、タマネギ由来の c D N A を鋳型として、P C R 反応を行って、約 6 6 0 b p の産物 (産物 A) を得た。

また、E 2 - 3 - N 9 - 1 のフォワードプライマーの代わりに、E 2 - 3 - N 9 - 2 をフォワードプライマーとして用いた P C R を行い、同様に約 6 6 0 b p の産物 (産物 B) を得た。

得られた産物 A 及び B を、先に述べた塩基配列の決定方法に従って、p G E M - T E a s y V e c t o r にサブクローニングした後、大腸菌 (X L 1 - B l u e) に導入し、塩基配列を解析した。図 7 に、サブクローニングの手順を示す。

産物 A が組み込まれた p G E M - T E a s y V e c t o r を持つ大腸菌の中から、配列番号 3 で示されるポリペプチドをコードする塩基配列を持つ大腸菌 (X L 1 - B l u e / p G E M - T - E 2 - 3 - 1) を得た。X L 1 - B l u e / p G E M - T - E 2 - 3 - 1 に導入された産物 A の塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号 6 及び配列番号 7、及び図 5 に示す。



同様に、産物Bが組み込まれたpGEM-T Easy Vectorを持つ大腸菌の中から、配列番号3のアミノ酸配列番号4位のAspだけが、Asnに置き代わったポリペプチドをコードする塩基配列を持つ大腸菌(XL1-Blue/pGEM-T-E2-3-2)を得た。

- 5 XL1-Blue/pGEM-T-E2-3-2に導入された産物Bの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号8及び配列番号9、及び図6に示す。

- 蛋白質の発現用ベクターとして、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)遺伝子の配列の下流にプロテアーゼ認識部位とマルチクローニングサイトを持つ、pGEX-4T-3(アマシャムファルマシア製)を用いた(図8)。

- pGEX-4T-3をEcoRI(Takara社製)とNotI(Takara社製)で切断して得られる大断片と上記pGEM-T-E2-3-1をEcoRIとNotIで切断して得た約700bpの断片を連結し、発現プラスミドpGEX-4T-3-E2-3-1を構築した。

同様に、pGEX-4T-3をEcoRIとNotIで切断して得られる大断片と上記pGEM-T-E2-3-2をEcoRIとNotIで切断して得た約700bpの断片を連結し、発現プラスミドpGEX-4T-3-E2-3-2も構築した。

20

- (12) 発現プラスミドを用いた大腸菌の形質転換体の作製と培養 コンピテントセル法により、上記のpGEX-4T-3-E2-3-1を大腸菌BL21-Gold(STRATAGENE社製)に導入し、形質転換体BL21-Gold/pGEX-4T-3-E2-3-1(FERM BP-7675)を得た(図8)。

25

また、同様に、pGEX-4T-3-E2-3-2を大腸菌BL21

-G o l d (S T R A T A G E N E 社製) に導入し、形質転換体 B L 2 1-G o l d / p G E X - 4 T - 3 - E 2 - 3 - 2 を得た。

得られた形質転換体を  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む L B 培地で  $37^\circ\text{C}$  で振とう培養した。培地にイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (I P T G) を添加して生産誘導すると G S T と E 2 - 3 - 1 の融合蛋白質 (以下、当該融合蛋白質を G S T - E 2 - 3 - A s p という)、並びに G S T と E 2 - 3 - 2 の融合蛋白質 (以下、当該蛋白質を G S T - E 2 - 3 - A s n という) が菌体内に蓄積した。

#### 10 (13) 蛋白質の単離 (精製)

上記のようにして形質転換体を培養し、菌体を遠心分離によって集めた後、超音波破碎した。遠心によって回収した上澄をグルタチオンセファロース 4 F a s t F l o w カラム (アマシャムファルマシア製) に流し、G S T 融合蛋白質をカラムに吸着させた。カラムを洗浄後、還元型グルタチオンを含む溶出 B u f f e r で、融合蛋白質を溶出し、2 種の E 2 - 3 融合蛋白質試料 (G S T - E 2 - 3 - A s p、G S T - E 2 - 3 - A s n) の精製物を得た。

融合蛋白質試料 2 種を H i T r a p D e s a l t i n g カラム (アマシャムファルマシア製) に流し、還元型グルタチオンを除去し、再度グルタチオンセファロース 4 F a s t F l o w カラムに吸着させた。カラムを洗浄後、トロンピンを含む B u f f e r でカラムを満たし、室温で 2 時間プロテアーゼ処理を行って、G S T タグを融合蛋白質から切り離した。G S T タグを除いた組換え E 2 - 3 - A s p 及び E 2 - 3 - A s n をカラムから溶出させ、更に、この溶出液に B e n z a m i d i n e S e p h a r o s e 6 B を加え混合し、遠心分離することによって、溶出液中のトロンピンを除き、2 種の組換え E 2 - 3 試料 (R

C-E 2-3-Asp、RC-E 2-3-Asn)を得た。

#### (14) 組換え蛋白質の催涙成分生成酵素活性

融合蛋白質試料であるGST-E 2-3-Asp、GST-E 2-3-Asn並びに、GSTタグを取り除いた組換えE 2-3試料である、RC-E 2-3-Asp、RC-E 2-3-Asnの4試料について催涙成分生成酵素活性を測定した。

その結果、融合蛋白質試料であるGST-E 2-3-Asp及びGST-E 2-3-Asnでは、催涙成分生成酵素活性が検出された。一方、E 2-3遺伝子を導入しなかった発現プラスミドpGEX-4Tで作製した形質転換体(BL 21-Gold/pGEX-4T-GST)を培養し、グルタチオンセファロースカラム処理をしても催涙成分生成酵素活性は検出されなかった。また、試料の代わりにリン酸Bufferを使ったBlankでも、催涙成分生成酵素活性が無かった。図9にグルタチオンセファロース4 Fast Flowカラムからの溶出液を5000倍に希釈した試料で行った活性測定結果を示す。

以上の結果から、E 2-3のN末端に、GST(分子量約27000)のような大きな蛋白質が結合した融合蛋白質でも、催涙成分生成酵素活性を有することが確認できた。

また、RC-E 2-3-Asp及びRC-E 2-3-Asnにも催涙成分生成酵素活性が検出されたので、ブラッドフォード法で蛋白質を定量し、比活性を算出した。

その結果、RC-E 2-3-AspとRC-E 2-3-Asnの比活性には、差が無いことがわかった。また、天然のE 2-3と組換えで得たE 2-3の比活性も同レベルであることがわかった。

試料名	比活性 (a r e a / m g)
R C - E 2 - 3 - A s p	4 . 4 × 1 0 <sup>8</sup>
R C - E 2 - 3 - A s n	4 . 1 × 1 0 <sup>8</sup>
天然体 E 2 - 3	2 . 5 × 1 0 <sup>8</sup>

5

## 産業上の利用可能性

本発明は、タマネギを破碎又は切断した時に発生する催涙成分を生成させる活性を有する催涙成分生成酵素のアイソザイム、その蛋白質又はポリペプチドのアミノ酸配列及びそれをコードするDNA等に係り、本

10 発明によれば、1) 従来方法では精製することが困難であったE2酵素の3種のアイソザイム(E2-1、E2-2、E2-3)を単離し、提供することができる、2) これらのアイソザイムのアミノ酸配列を提供することができる、3) これらのアイソザイムをコードする塩基配列を提供することができる、4) 上記アミノ酸配列及びこれをコードするD

15 NAは、例えば、破碎又は切断時に発生する催涙成分量を低減させたタマネギ品種の開発において、交配に供する材料を選抜する指標などとして有用である、5) 上記DNAから得られる情報は、当該酵素の発現量を抑制するために必要なアンチセンスヌクレオチドの設計に有用である、

6) 催涙成分生成酵素を遺伝子組換え技術により効率的に作り出すこと

20 が可能となる、7) 涙欠乏症(ドライアイ)などの治療に役立つ催涙成分を効率的に生産することを実現化できる、という格別の効果を奏する。

## 寄託された微生物への言及

寄託機関の名称及びあて名：独立行政法人産業技術総合研究所

25 特許生物寄託センター(あて名；日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566))

寄託した日付：2001年7月25日

受託番号：FERM BP-7675

微生物の表示：E2-3-1

## 請求の範囲

1. タマネギ等に存在する催涙成分前駆体に作用して催涙成分を生成する活性を有する催涙成分生成酵素を、その等電点の差を利用して、精製して得られる催涙成分生成酵素のアイソザイム。

2. 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列中の 1 もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含み、催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチド。

3. 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列中の 1 もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含み、催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチド。

4. 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列中の 1 もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を含み、催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチド。

5. 請求項 2、3 又は 4 に記載の蛋白質又はポリペプチドをコードする塩基配列を含有する DNA。

6. 蛋白質又はポリペプチドをコードする塩基配列が、配列番号 4 で示される DNA である請求項 5 に記載の DNA。

7. 蛋白質又はポリペプチドをコードする塩基配列を含有する DNA が、配列番号 5 で示される DNA である請求項 5 に記載の DNA。

8. 所望の遺伝子産物をコードする塩基配列とベクターとを有し、該塩基配列が請求項5、6又は7に記載の塩基配列であることを特徴とする組換えベクター。

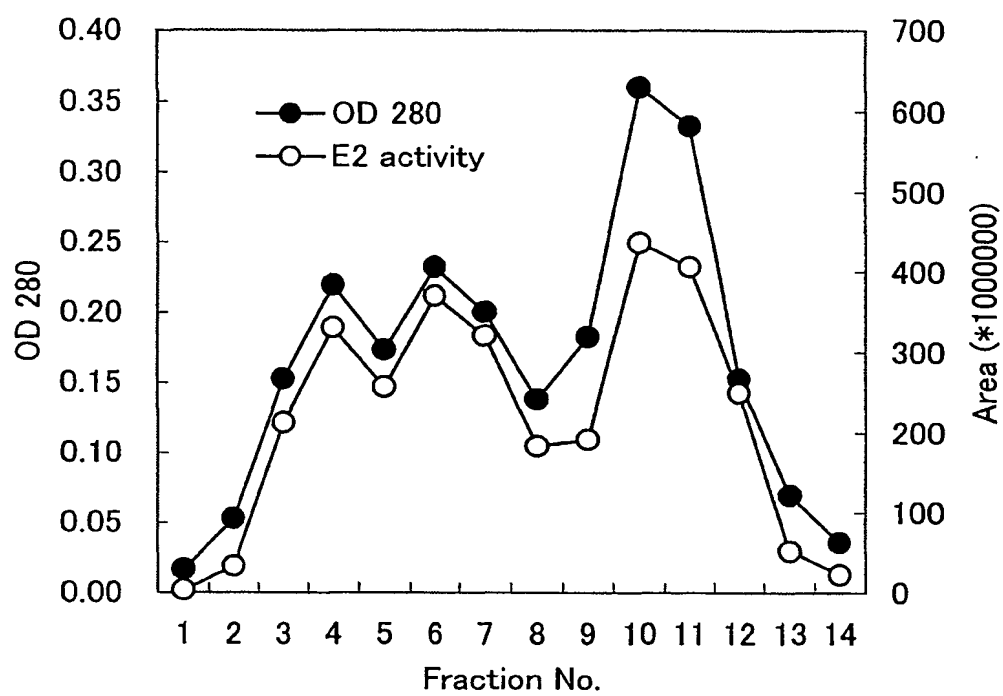
5 9. 請求項8に記載の組換えベクターで微生物を形質転換した形質転換体。

10 10. タマネギ等に存在する催涙成分前駆体に作用して催涙成分を生成する催涙成分生成酵素を、その等電点の差を利用して、精製することによりアイソザイムE2-1、E2-2、又はE2-3を分離することを特徴とする催涙成分生成酵素のアイソザイムの製造方法。

15 11. 請求項5、6又は7に記載のDNAを含有する組換えベクターで形質転換した宿主細胞を培養し、培地中又は細胞中に産生された催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチドを分離することを特徴とする、催涙成分生成酵素活性を有する蛋白質又はポリペプチドの製造方法。

20 12. 請求項5、6又は7に記載のDNAに対応するmRNAに対して相補的塩基配列を有することを特徴とするアンチセンスRNA。

1 / 9





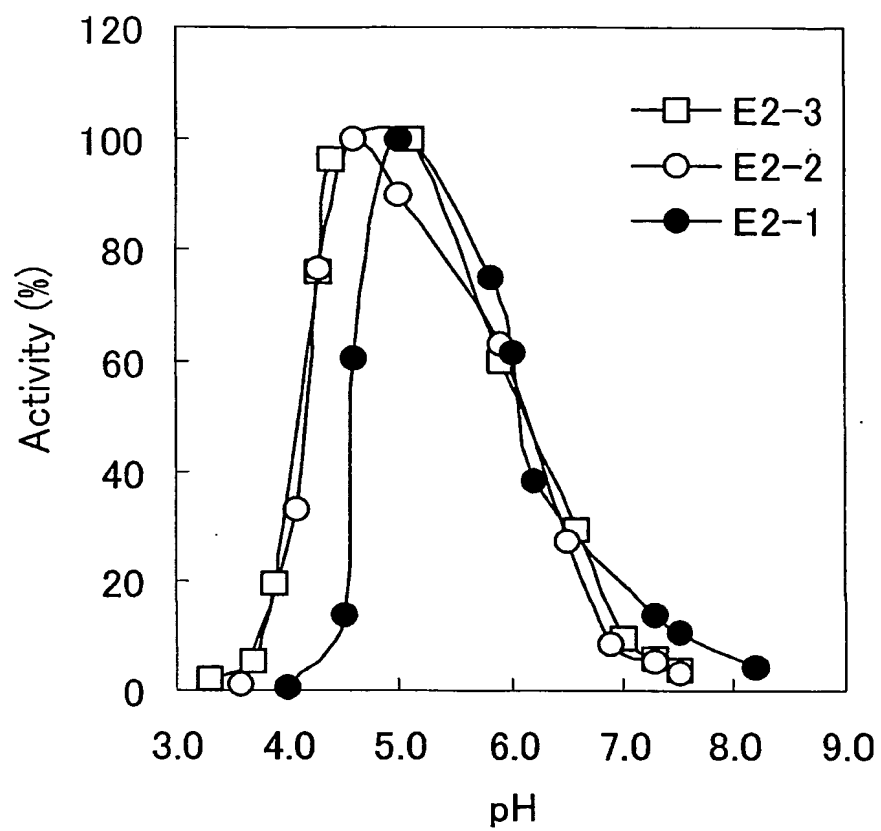


図 2

至適温度

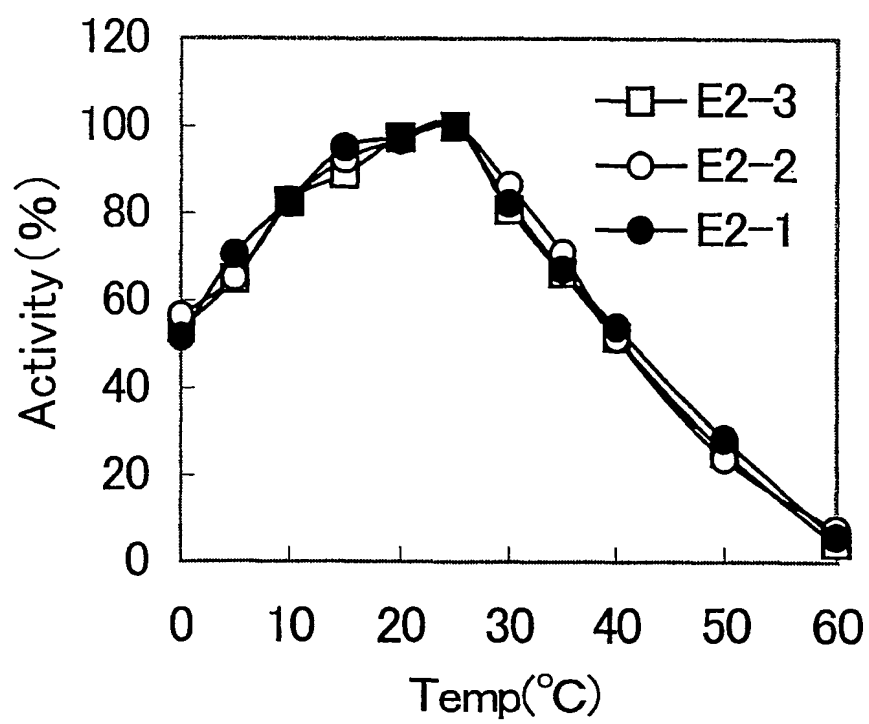


図 3

4 / 9

```

ACAATTCAGA CTCACATTAC GTTATATCAA GAAGATTGTC CAATCAGAAA AA ATG GAG CTA      61
                                     Met Glu Leu
                                     -15
AAT CCT GGT GCA CCT GCT GTA GTC GCT GAT AGT GCT AAC GGA GCT CGA AAA TGG AGC GGC 121
Asn Pro Gly Ala Pro Ala Val Val Ala Asp Ser Ala Asn Gly Ala Arg Lys Trp Ser Gly
      -10      -5      1      5
AAA GTC CAT GCT TTG CTT CCA AAT ACA AAG CCA GAG CAA GCA TGG ACA CTA CTA AAA GAC 181
Lys Val His Ala Leu Leu Pro Asn Thr Lys Pro Glu Gln Ala Trp Thr Leu Leu Lys Asp
      10      15      20      25
TTT ATT AAC CTT CAC AAG GTC ATG CCT TCG TTG TCA GTC TGT GAA CTG GTA GAA GGT GAG 241
Phe Ile Asn Leu His Lys Val Met Pro Ser Leu Ser Val Cys Glu Leu Val Glu Gly Glu
      30      35      40      45
GCC AAT GTT GTT GGT TGT GTT CGC TAC GTT AAA GGT ATA ATG CAC CCA ATA GAA GAG GAA 301
Ala Asn Val Val Gly Cys Val Arg Tyr Val Lys Gly Ile Met His Pro Ile Glu Glu Glu
      50      55      60      65
TTT TGG GCC AAG GAG AAG CTG GTG GCG CTG GAT AAT AAG AAC ATG AGC TAC AGT TAT ATT 361
Phe Trp Ala Lys Glu Lys Leu Val Ala Leu Asp Asn Lys Asn Met Ser Tyr Ser Tyr Ile
      70      75      80      85
TTT ACT GAG TGT TTT ACA GGG TAC GAG GAT TAC ACG GCT ACC ATG CAA ATA GTG GAG GGT 421
Phe Thr Glu Cys Phe Thr Gly Tyr Glu Asp Tyr Thr Ala Thr Met Gln Ile Val Glu Gly
      90      95      100      105
CCT GAG CAC AAG GGA AGT AGA TTT GAC TGG TCT TTT CAG TGC AAG TAT ATC GAG GGT ATG 481
Pro Glu His Lys Gly Ser Arg Phe Asp Trp Ser Phe Gln Cys Lys Tyr Ile Glu Gly Met
      110      115      120      125
ACT GAA TCT GCA TTC ACC GAG ATT CTG CAG CAT TGG GCT ACT GAG ATA GGT CAG AAA ATC 541
Thr Glu Ser Ala Phe Thr Glu Ile Leu Gln His Trp Ala Thr Glu Ile Gly Gln Lys Ile
      130      135      140      145
GAA GAG GTT TGC AGT GCT TGATCATGAA TATCGGTTTT CAGTGCTGTG ATGCATTATG      599
Glu Glu Val Cys Ser Ala
      150
TGTCTTTTAA ACCTTGTCTT GTGATATAAT AAAGTAACGT AATATGTGCA TGTAATAAGT      659
AAGACTGAGT GTTGTGTGTT CAATAAAAAA GAATTTGCTT TTTGCAAGTT CTAGTGCTTT      719
TCAAAAAAAA AAAAAAAA      737

```

5 / 9

```

      10      20      30      40      50      60
AATTCGATTGATAGTGGGACGGGGCGCGGAAATGGAGCGGCAAAGTCCATGCTTTGCTT
AsnSerIleAspSerAlaAspGlyAlaArgLysTrpSerGlyLysValHisAlaLeuLeu
      70      80      90     100     110     120
CCAAATACAAAGCCGGAGCAAGCATGGACACTACTAAAAGACTTTATTAACCTTCACAAG
ProAsnThrLysProGluGlnAlaTrpThrLeuLeuLysAspPheIleAsnLeuHisLys
      130     140     150     160     170     180
GTCATGCCTTCGTTGTCAGTCTGTGAAGTGGTAGAAGGTGAGGCCAATGTTGTTGGTTGT
ValMetProSerLeuSerValCysGluLeuValGluGlyGluAlaAsnValValGlyCys
      190     200     210     220     230     240
GTTTCGCTACGTTAAAGGTATAATGCACCCAATAGAAGAGGAATTTGGGCCAAGGAGAAG
ValArgTyrValLysGlyIleMetHisProIleGluGluGluPheTrpAlaLysGluLys
      250     260     270     280     290     300
CTGGTGGCGCTGGATAATAAGAACATGAGCTACAGTTATATTTTACTGAGTGTTTTACA
LeuValAlaLeuAspAsnLysAsnMetSerTyrSerTyrIlePheThrGluCysPheThr
      310     320     330     340     350     360
GGGTACGAGGATTACACGGCTACCATGCAAATAGTGGAGGGTCCTGAGCACAAGGGAAGT
GlyTyrGluAspTyrThrAlaThrMetGlnIleValGluGlyProGluHisLysGlySer
      370     380     390     400     410     420
AGATTTGACTGGTCTTTTTCAGTGCAAGTATATCGAGGGTATGACTGAATCTGCATTCACC
ArgPheAspTrpSerPheGlnCysLysTyrIleGluGlyMetThrGluSerAlaPheThr
      430     440     450     460     470     480
GAGATTCTGCAGCATTGGGCTACTGAGATAGGTCAGAAAAATCGAAGAGGTTTGCACTGCT
GluIleLeuGlnHisTrpAlaThrGluIleGlyGlnLysIleGluGluValCysSerAla
      490     500     510     520     530     540
TGATCATGAATATCGTTTATGCTGTGATGCATTATTTGTGTTTTAAACCGTGTCTGTGA
***
      550     560     570     580     590     600
TATAATAAAGTAACGTCAITTTGTGCACGTAATAAGTAAAGCCCGAGTGTTGTGTGTTCAA

      610     620     630     640     650     660
TAAAAAAGAACTTGCTTTTTGCAGGTTCTAGTGCTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
      670
AAAAAATTCCTGC

```

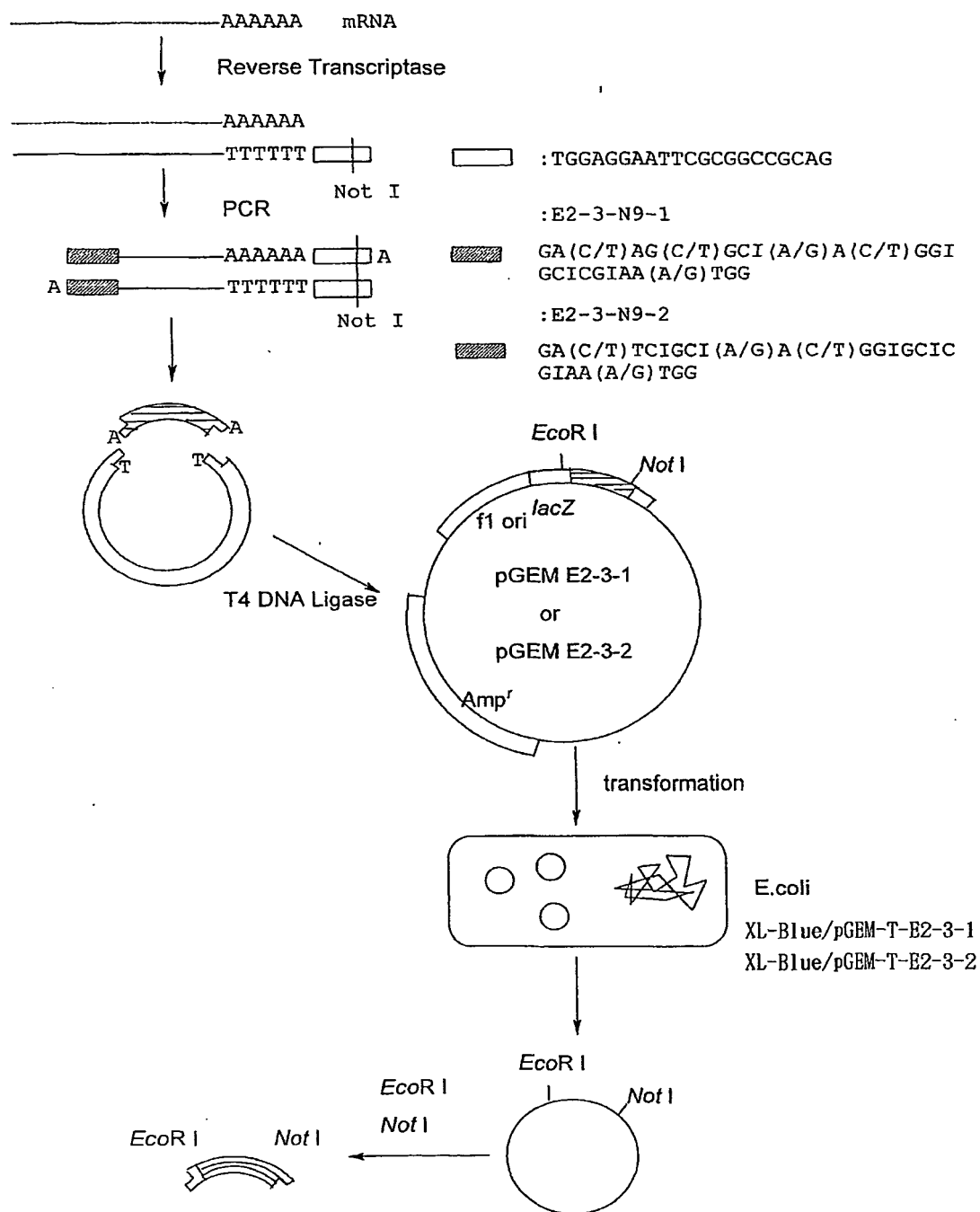
6 / 9

```

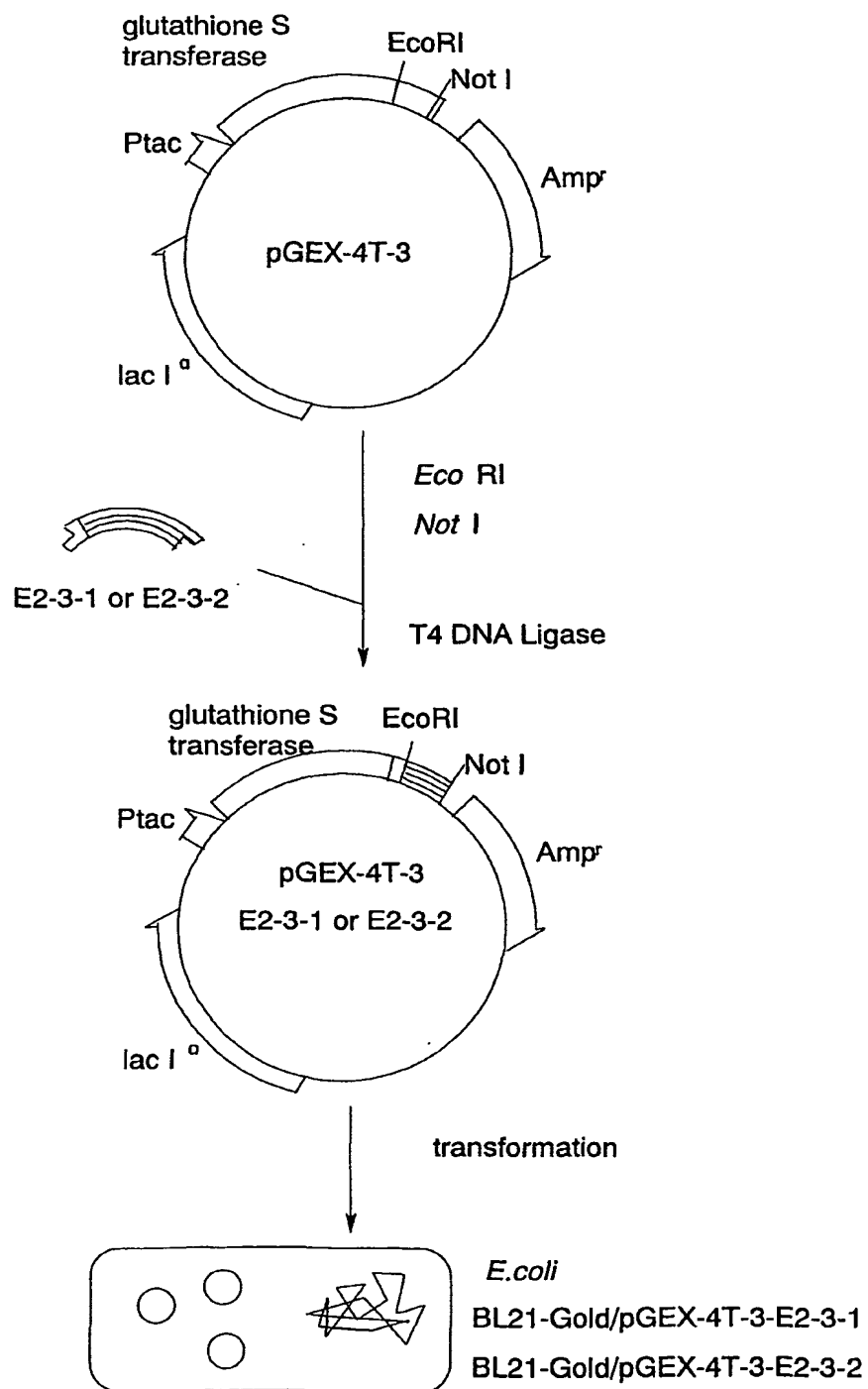
      10      20      30      40      50      60
AATTCGATTGATTCCGGCGAATGGGGCGCGGAAGTGGAGCGGCAAAGTCCATGCTTTGCTT
AsnSerIleAspSerAlaAsnGlyAlaArgLysTrpSerGlyLysValHisAlaLeuLeu
      70      80      90     100     110     120
CCAAATACAAAGCCAGAGCAAGCATGGACACTACTAAAAGACTTTATTAACTTCACAAG
ProAsnThrLysProGluGlnAlaTrpThrLeuLeuLysAspPheIleAsnLeuHisLys
     130     140     150     160     170     180
GTCATGCCTTCGTTGTCTGCTGTAAGTGGTAGAAGGTGAGGCCAATGTTGTTGGTTGT
ValMetProSerLeuSerValCysGluLeuValGluGlyGluAlaAsnValValGlyCys
     190     200     210     220     230     240
GTTTCGCTACGTTAAAGGTATAATGCACCCAATAGAAGAGGAATTTTGGGCCAAGGAGAAG
ValArgTyrValLysGlyIleMetHisProIleGluGluGluPheTrpAlaLysGluLys
     250     260     270     280     290     300
CTGGTGGCGCTGGATAATAAGAACATGAGCTACAGTTATATTTTACTGAGTGTTTTACA
LeuValAlaLeuAspAsnLysAsnMetSerTyrSerTyrIlePheThrGluCysPheThr
     310     320     330     340     350     360
GGGTACGAGGATTACACGGCTACCATGCAAATAGTGGAGGGTCTGAGCACAAGGGAAGT
GlyTyrGluAspTyrThrAlaThrMetGlnIleValGluGlyProGluHisLysGlySer
     370     380     390     400     410     420
AGATTTGACTGGTCTTTTTCAGTGCAAGTATATCGAGGGTATGACTGAATCTGCATTACCC
ArgPheAspTrpSerPheGlnCysLysTyrIleGluGlyMetThrGluSerAlaPheThr
     430     440     450     460     470     480
GAGATTCTGCAGCATTGGGCTACTGAGTAGGTCAGAAAATCGAAGAGGTTTGCAGTGCT
GluIleLeuGlnHisTrpAlaThrGluIleGlyGlnLysIleGluGluValCysSerAla
     490     500     510     520     530     540
TGATCATGAATATCGGTTTTTCAGTGCTGTGATGCATTATGTGTCTTTTAAACCTGTCTT
***
     550     560     570     580     590     600
GTGATATAATAAAGTAACGTAATATGTGCATGTAATAAGTAAGACTGAGTGTTGTGTGT
      610      620      630      640      650      660
CAATAAAAAAGAATTTGCTTTTTGCAAGTTCTAGTGCTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
      670
AAAAAATTCCTGC

```

7 / 9



8 / 9



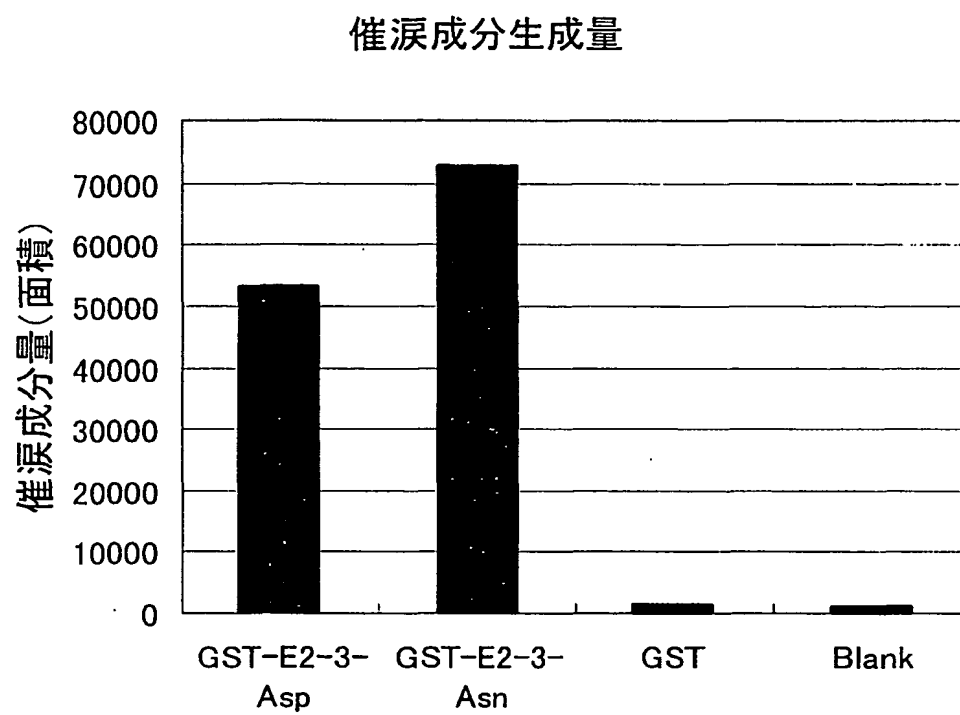


図 9



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; HOUSE FOODS CORPORATION

<120> GENE OF ENZYME HAVING ACTIVITY TO GENERATE LACHRYMATORY  
FACTOR

&lt;130&gt; F-0107

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP P2000-267813

&lt;151&gt; 2000-09-04

&lt;160&gt; 9

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 153

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Allium cepa

&lt;400&gt; 1

Gly Ala Arg Lys Trp Ser Gly Lys Val His Ala Leu Leu Pro Asn Thr  
1 5 10 15

Lys Pro Glu Gln Ala Trp Thr Leu Leu Lys Asp Phe Ile Asn Leu His  
20 25 30

Lys Val Met Pro Ser Leu Ser Val Cys Glu Leu Val Glu Gly Glu Ala  
35 40 45

Asn Val Val Gly Cys Val Arg Tyr Val Lys Gly Ile Met His Pro Ile  
50 55 60

Glu Glu Glu Phe Trp Ala Lys Glu Lys Leu Val Ala Leu Asp Asn Lys  
65 70 75 80

Asn Met Ser Tyr Ser Tyr Ile Phe Thr Glu Cys Phe Thr Gly Tyr Glu  
85 90 95

Asp Tyr Thr Ala Thr Met Gln Ile Val Glu Gly Pro Glu His Lys Gly  
100 105 110

Ser Arg Phe Asp Trp Ser Phe Gln Cys Lys Tyr Ile Glu Gly Met Thr  
115 120 125

Glu Ser Ala Phe Thr Glu Ile Leu Gln His Trp Ala Thr Glu Ile Gly  
 130 135 140

Gln Lys Ile Glu Glu Val Cys Ser Ala  
 145 150

<210> 2

<211> 155

<212> PRT

<213> Allium cepa

<400> 2

Ala Asp Gly Ala Arg Lys Trp Ser Gly Lys Val His Ala Leu Leu Pro  
 1 5 10 15

Asn Thr Lys Pro Glu Gln Ala Trp Thr Leu Leu Lys Asp Phe Ile Asn  
 20 25 30

Leu His Lys Val Met Pro Ser Leu Ser Val Cys Glu Leu Val Glu Gly  
 35 40 45

Glu Ala Asn Val Val Gly Cys Val Arg Tyr Val Lys Gly Ile Met His  
 50 55 60

Pro Ile Glu Glu Glu Phe Trp Ala Lys Glu Lys Leu Val Ala Leu Asp  
 65 70 75 80

Asn Lys Asn Met Ser Tyr Ser Tyr Ile Phe Thr Glu Cys Phe Thr Gly  
 85 90 95

Tyr Glu Asp Tyr Thr Ala Thr Met Gln Ile Val Glu Gly Pro Glu His  
 100 105 110

Lys Gly Ser Arg Phe Asp Trp Ser Phe Gln Cys Lys Tyr Ile Glu Gly  
 115 120 125

Met Thr Glu Ser Ala Phe Thr Glu Ile Leu Gln His Trp Ala Thr Glu  
 130 135 140

Ile Gly Gln Lys Ile Glu Glu Val Cys Ser Ala  
 145 150 155

<210> 3

<211> 157

<212> PRT

&lt;213&gt; Allium cepa

&lt;400&gt; 3

Asp Ser Ala Asp Gly Ala Arg Lys Trp Ser Gly Lys Val His Ala Leu  
 1 5 10 15

Leu Pro Asn Thr Lys Pro Glu Gln Ala Trp Thr Leu Leu Lys Asp Phe  
 20 25 30

Ile Asn Leu His Lys Val Met Pro Ser Leu Ser Val Cys Glu Leu Val  
 35 40 45

Glu Gly Glu Ala Asn Val Val Gly Cys Val Arg Tyr Val Lys Gly Ile  
 50 55 60

Met His Pro Ile Glu Glu Glu Phe Trp Ala Lys Glu Lys Leu Val Ala  
 65 70 75 80

Leu Asp Asn Lys Asn Met Ser Tyr Ser Tyr Ile Phe Thr Glu Cys Phe  
 85 90 95

Thr Gly Tyr Glu Asp Tyr Thr Ala Thr Met Gln Ile Val Glu Gly Pro  
 100 105 110

Glu His Lys Gly Ser Arg Phe Asp Trp Ser Phe Gln Cys Lys Tyr Ile  
 115 120 125

Glu Gly Met Thr Glu Ser Ala Phe Thr Glu Ile Leu Gln His Trp Ala  
 130 135 140

Thr Glu Ile Gly Gln Lys Ile Glu Glu Val Cys Ser Ala  
 145 150 155

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 737

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Allium cepa

&lt;400&gt; 4

acaattcaga ctcacattac gttatatcaa gaagattgtc caatcagaaa aaatggagct 60  
 aaatcctggt gcacctgctg tagtcgctga tagtgctaac ggagctcgaa aatggagcgg 120  
 caaagtccat gctttgcttc caaatacaaaa gccagagcaa gcatggacac tactaaaaga 180  
 ctttattaac cttcacaagg tcatgccttc gttgtcagtc tgtgaactgg tagaaggtga 240  
 ggccaatggt gttggttggtg ttcgctacgt taaaggtata atgcacccaa tagaagagga 300  
 attttgggcc aaggagaagc tgggtggcgct ggataataag aacatgagct acagttatat 360  
 ttttactgag tgttttacag ggtacgagga ttacacggct accatgcaaa tagtggaggg 420  
 tcctgagcac aagggaagta gatttgactg gtcttttcag tgcaagtata tcgagggtat 480

```

gactgaatct gcattcaccg agattctgca gcattgggct actgagatag gtcagaaaaat 540
cgaagagggtt tgcagtgcct gatcatgaat atcggttttc agtgctgtga tgcattatgt 600
gtctttttaa ccttgtcttg tgatataata aagtaacgta atatgtgcat gtaataagta 660
agactgagtg ttgtgtgttc aataaaaaag aatttgcttt ttgcaagttc tagtgctttt 720
caaaaaaaaa aaaaaaa 737

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 507

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Allium cepa

&lt;400&gt; 5

```

atggagctaa atcctggtgc acctgctgta gtcgctgata gtgctaacgg agctcgaaaa 60
tggagcggca aagtccatgc tttgcttcca aatacaaagc cagagcaagc atggacacta 120
ctaaaagact ttattaacct tcacaaggtc atgccttcgt tgtcagtcctg tgaactggta 180
gaagggtgagg ccaatgttgt tggttgtgtt cgctacgtta aagggtataat gcaccaata 240
gaagaggaat tttgggccaa ggagaagctg gtggcgctgg ataataagaa catgagctac 300
agttatatatt ttactgagtg ttttacaggg tacgaggatt acacggctac catgcaaata 360
gtggaggggc ctgagcaciaa ggggaagtaga tttgactggc cttttcagtg caagtataatc 420
gagggtatga ctgaatctgc attcaccgag attctgcagc attgggctac tgagataggt 480
cagaaaatcg aagaggtttg cagtgcct 507

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 673

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Allium cepa

&lt;400&gt; 6

```

aattcgattg atagtgcgga cggggcgcgg aaatggagcg gcaaagtcca tgctttgctt 60
ccaaatacaa agccggagca agcatggaca ctactaaaag actttattaa ccttcacaag 120
gtcatgcctt cgttgtcagt ctgtgaactg gtagaagggt aggccaatgt tgttggttgt 180
gttcgctacg ttaaagggtat aatgcaccca atagaagagg aattttgggc caaggagaag 240
ctggtggcgc tggataataa gaacatgagc tacagttata tttttactga gtgttttaca 300
gggtacgagg attacacggc taccatgcaa atagtggagg gtcctgagca caagggaagt 360
agatttgact ggtcttttca gtgcaagtat atcgagggtg tgactgaatc tgcattcacc 420
gagattctgc agcattgggc tactgagata ggtcagaaaa tcgaagaggt ttgcagtgc 480
tgatcatgaa tatcgtttat gctgtgatgc attatttgtg ttttaaaccg tgtcctgtga 540
tataataaag taacgtcatt tgtgcacgta ataagtaaag cccgagtgtt gtgtgttcaa 600
taaaaaagaa cttgcttttt gcaggttcta gtgcttttca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660
aaaaaattcc tgc 673

```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 160

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Allium cepa

&lt;400&gt; 7

Asn Ser Ile Asp Ser Ala Asp Gly Ala Arg Lys Trp Ser Gly Lys Val  
 1 5 10 15

His Ala Leu Leu Pro Asn Thr Lys Pro Glu Gln Ala Trp Thr Leu Leu  
 20 25 30

Lys Asp Phe Ile Asn Leu His Lys Val Met Pro Ser Leu Ser Val Cys  
 35 40 45

Glu Leu Val Glu Gly Glu Ala Asn Val Val Gly Cys Val Arg Tyr Val  
 50 55 60

Lys Gly Ile Met His Pro Ile Glu Glu Glu Phe Trp Ala Lys Glu Lys  
 65 70 75 80

Leu Val Ala Leu Asp Asn Lys Asn Met Ser Tyr Ser Tyr Ile Phe Thr  
 85 90 95

Glu Cys Phe Thr Gly Tyr Glu Asp Tyr Thr Ala Thr Met Gln Ile Val  
 100 105 110

Glu Gly Pro Glu His Lys Gly Ser Arg Phe Asp Trp Ser Phe Gln Cys  
 115 120 125

Lys Tyr Ile Glu Gly Met Thr Glu Ser Ala Phe Thr Glu Ile Leu Gln  
 130 135 140

His Trp Ala Thr Glu Ile Gly Gln Lys Ile Glu Glu Val Cys Ser Ala  
 145 150 155 160

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 673

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Allium cepa

&lt;400&gt; 8

aattcgattg attcggcgaa tggggcgcgg aagtggagcg gcaaagtcca tgctttgctt 60  
 ccaaatacaa agccagagca agcatggaca ctactaaaag actttattaa ccttcacaag 120  
 gtcatgcctt cgttgtcagt ctgtgaactg gtagaagggtg aggccaatgt tgttgggttg 180  
 gttcgctacg ttaaaggat aatgcaccca atagaagagg aattttgggc caaggagaag 240  
 ctggtggcgc tggataataa gaacatgagc tacagttata tttttactga gtgttttaca 300  
 gggtagcagg attacacggc taccatgcaa atagtggagg gtcctgagca caagggaagt 360

```

agatttgact ggtcttttca gtgcaagtat atcgagggtg tgactgaatc tgcattcacc 420
gagattctgc agcattgggc tactgagata ggtcagaaaa tcgaagaggt ttgcagtgct 480
tgatcatgaa tatcggtttt cagtgtgtg atgcattatg tgtcttttaa accttgtctt 540
gtgatataat aaagtaacgt aatatgtgca tgtaataagt aagactgagt gttgtgtgtt 600
caataaaaaa gaatttgctt ttgcaagtt ctagtgcttt tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660
aaaaaattcc tgc 673

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 160

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Allium cepa

&lt;400&gt; 9

```

Asn Ser Ile Asp Ser Ala Asn Gly Ala Arg Lys Trp Ser Gly Lys Val
  1              5              10              15

```

```

His Ala Leu Leu Pro Asn Thr Lys Pro Glu Gln Ala Trp Thr Leu Leu
      20              25              30

```

```

Lys Asp Phe Ile Asn Leu His Lys Val Met Pro Ser Leu Ser Val Cys
      35              40              45

```

```

Glu Leu Val Glu Gly Glu Ala Asn Val Val Gly Cys Val Arg Tyr Val
      50              55              60

```

```

Lys Gly Ile Met His Pro Ile Glu Glu Glu Phe Trp Ala Lys Glu Lys
      65              70              75              80

```

```

Leu Val Ala Leu Asp Asn Lys Asn Met Ser Tyr Ser Tyr Ile Phe Thr
      85              90              95

```

```

Glu Cys Phe Thr Gly Tyr Glu Asp Tyr Thr Ala Thr Met Gln Ile Val
      100              105              110

```

```

Glu Gly Pro Glu His Lys Gly Ser Arg Phe Asp Trp Ser Phe Gln Cys
      115              120              125

```

```

Lys Tyr Ile Glu Gly Met Thr Glu Ser Ala Phe Thr Glu Ile Leu Gln
      130              135              140

```

```

His Trp Ala Thr Glu Ile Gly Gln Lys Ile Glu Glu Val Cys Ser Ala
      145              150              155              160

```

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07465

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. <sup>7</sup> C12N15/61, 9/90, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. <sup>7</sup> C12N15/00-15/90, 9/90		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ SWISSPROT/PIR/GENESEQ BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10-295373 A (House Food Ind. Co., Ltd.), 10 November, 1998 (10.11.98) (Family: none)	1-12
A	BLOCK E. et al., The organosulfur chemistry of the genus Allium: Implications for the organic chemistry of sulfur. Angewandte Chemie International Edition in English, 1992, 31(9), pages 1135-1178	1-12
A	KREST I. et al., Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some allium species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, August 2000, 48(8), pages 3753-3760	1-12
A	KOPSELL D.E. et al., Changes in the S-alk(en)yl cysteine sulfoxides and their biosynthetic intermediates during onion storage. Journal of the American Society for Horticultural Science, March 1999, 124(2), pages 177-183	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 13 November, 2001 (13.11.01)		Date of mailing of the international search report 27 November, 2001 (27.11.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/61, 9/90, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, 9/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ  
SWISSPROT/PIR/GENESEQ  
BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 10-295373 A (ハウス食品株式会社) 10. 11月. 1998 (10. 11. 98) ファミリーなし	1-12
A	BLOCK E. et al., The organosulfur chemistry of the genus Allium: Implications for the organic chemistry of sulfur. Angewandte Chemie International Edition in English, 1992, 31(9), p. 1135-1178	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 11. 01

国際調査報告の発送日

27.11.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4 B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KREST I. et al., Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some allium species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Aug. 2000, 48(8), p. 3753-3760	1-12
A	KOPSELL D. E. et al., Changes in the S-alk(en)yl cysteine sulfoxides and their biosynthetic intermediates during onion storage. Journal of the American Society for Horticultural Science, March 1999, 124(2), p. 177-183	1-12